水稻 *OsZAT12* 基因响应非生物胁迫和植物激素的研究

陈言博[1]，陈宗新[1]，夏快飞[2]，张明永[2]，王亚琴[1*]
（1. 华南师范大学 生命科学学院，广州 510631；2. 中国科学院华南植物园，广州 510650）

摘 要：C2H2 锌指蛋白是真核生物体内一类重要的转录因子，在植物生长发育和应对非生物胁迫方面具有重要的作用。实验室前期克隆了水稻 C2H2 锌指蛋白 OsZAT12，该基因在水稻根中特异表达，定位于细胞核，异源过表达 *OsZAT12* 的拟南芥植株矮小。为进一步研究 *OsZAT12* 在水稻中的功能，该文分析了 *OsZAT12* 的启动子元件和转录活性，采用 qRT-PCR技术分析 *OsZAT12* 在非生物胁迫和植物激素处理下的响应模式。结果表明：OsZAT12 含有2个典型的 C2H2 锌指结构域和 1 个 EAR motif，具有转录抑制活性，且该基因的启动子中含有与非生物胁迫和植物激素相关的元件。对野生型水稻进行非生物胁迫和激素处理发现，低温胁迫（4℃）和激素 ABA 处理显著下调 *OsZAT12* 的表达；而渗透胁迫（20% PEG 6000）、激素 BR 或 IAA 处理则显著上调 *OsZAT12* 的表达。说明 *OsZAT12* 介导了水稻应对多种非生物胁迫和激素的变化。利用含 35S 启动子的过表达载体和 CRISPR/Cas9 基因编辑技术分别得到纯合的 *OsZAT12* 过表达植株和 *OsZAT12* 敲除植株。对过表达 *OsZAT12* 的水稻表型观察发现，相比于野生型，*OsZAT12* 过表达植株在分蘖期、抽穗期和成熟期这三个时期的株高均显著降低；而 *OsZAT12* 敲除植株的株高与野生型没有明显差异，但每株穗数和结实率均显著低于野生型。说明 *OsZAT12* 影响了水稻株型、穗型及结实率等农艺性状的建成。实验进一步表明过表达 *OsZAT12* 降低了水稻对外源 ABA 的敏感性，而 *OsZAT12* 敲除植株则相反。综上，推测 *OsZAT12* 对植株生长发育的影响，可能与该基因响应多种非生物胁迫和激素信号的调控有关。该研究可将为利用 *OsZAT12* 进行水稻耐逆稳产分子设计育种提供实验依据。**关键词：**水稻，C2H2 锌指蛋白，OsZAT12，非生物胁迫，ABA

中图分类号： **文献标识码：**A 文章编号：

OsZAT12 gene responses to abiotic stresses and phytohormones in rice (*Oryza sativa*)

CHEN Yanbo[1], CHEN Zongxin[1], XIA Kuaifei[2], ZHANG Mingyong[2], WANG Yaqin[1*]
（1 *School of Life Sciences, South China Normal University*, Guangzhou 510631, China; 2 *South China Botanical Garden*, *Chinese Academy of Sciences*, Guangzhou 510650, China）

Abstract: C2H2 zinc finger proteins are a class of important transcription factors in eukaryotes, which play important roles in plant growth and development and in response to abiotic stresses. *OsZAT12*, a C2H2 zinc finger protein in rice, which cloned in our previous study, was only

基金项目：广东省自然科学基金团队项目（2017A030312004）；广东省应用型科技研究专项项目（2015B020231009）[Supported by Guangdong Provincial Natural Science Foundation Team Project (2017A030312004); Guangdong Province Applied Science and Technology Research Special Project (2015B020231009)]。

作者简介：陈言博(1989-)，博士，研究方向为植物分子生物学，（E-mail）chenyanbo1221@163.com。
***通信作者：**王亚琴，博士，教授，研究方向为植物生长发育，（E-mail）wangyaqin@m.scnu.edu.cn。

expressing in rice roots and localized in the nucleus. Overexpressing *OsZAT12* in Arabidopsis exhibited dwarf phenotype. To further investigate the function of *OsZAT12* in rice, qRT-PCR was used to analyze the response patterns of *OsZAT12* under abiotic stresses and phytohormones treatment, and the promoter elements and transcriptional activity of OsZAT12 was analyzed as well. The results show that OsZAT12 contains two typical C2H2 zinc finger domains and one EAR motif, and has transcriptional repressive activity. The promoter of the *OsZAT12* contains elements related to abiotic stresses and phytohormones. The results of abiotic stresses and phytohormones treatment in rice also revealed that low temperature stress (4°C) and phytohormone ABA treatment significantly down-regulated *OsZAT12* expression, while osmotic stress (20% PEG 6000), phytohormone BR or IAA treatment significantly up-regulated the expression of *OsZAT12*. These results indicate that *OsZAT12* involves in the changes in response to abiotic stresses and phytohormones in rice. Homozygous *OsZAT12* overexpression plants and *OsZAT12* knockout plants were obtained using overexpression vector with 35S promoter and CRISPR/Cas9 gene editing technology, respectively. Observation of the phenotype of *OsZAT12* overexpression rice showed that compared with the wild type, the plant height of *OsZAT12* overexpression plants was significantly shorter at tillering stage, heading stage and maturity stage. The plant height of *OsZAT12* knockout plants did not change significantly comparing with the wild type, while the panicle number and seed setting rate of them were significantly lower than those of the wild type. These results indicated that *OsZAT12* affected the establishment of agronomic traits such as rice plant type, panicle type and seed setting rate. The results in this study further showed that overexpression of *OsZAT12* reduces the sensitivity of rice to exogenous ABA, while the opposite phenotype was observed in *OsZAT12* knockout plants. Taken together, it is speculated that the effect of *OsZAT12* on plant growth and development might be related to the regulation of this gene in response to abiotic stresses and hormonal signals. This study might provide an experimental basis for molecular design breeding of stress-tolerant and stable yield using *OsZAT12* in rice.

Key words: rice, C2H2 zinc finger protein, OsZAT12, abiotic stresses, ABA

锌指蛋白是真核生物体内一类被广泛研究的转录因子家族，根据半胱氨酸（C）和组氨酸（H）残基的数目和位置可将其分为 C2H2、C2HC、C2C2、C2C2C2C2、C2HC、C2C2 等类型（Laity et al., 2001）。C2H2 型锌指蛋白是锌指蛋白中最常见的一类，在许多代谢途径以及植物的生长发育和非生物胁迫反应中起着至关重要的作用（Ballerini et al., 2020; Yin et al., 2020; Rodas et al., 2021; Zhang et al., 2021）。目前，在水稻和拟南芥中已经发现分别有 189 和 176 个 C2H2 型锌指蛋白，该类蛋白的锌指结构域具有 $CX_{2\text{-}4}CX_3FX_5LX_2HX_{3\text{-}5}H$（C：半胱氨酸，F：苯丙氨酸，H：组氨酸，L：亮氨酸，X：任意氨基酸）特征序列（Englbrecht et al., 2004; Agarwal et al., 2007）。根据锌指结构域的数目、序列和排列方式，拟南芥 176 个 C2H2 型锌指蛋白可分为 set A、set B 和 set C，其中包含多个且离散的锌指结构域的一类归为 set C（Pabo et al., 2001; Englbrecht et al., 2004; Ciftci-Yilmaz & Mittler, 2008）。根据锌指特征序列中 2 个组氨酸之间的氨基酸数目，set C 可进一步分为 C1、C2 和 C3；而 C1 家族可进一步细分为 C1-1i、C1-2i、C1-3i、C1-4i 和 C1-5i（Englbrecht et al., 2004）。有关 C1 家族的研究主要集中在 C1-1i 和 C1-2i 亚家族（Englbrecht et al., 2004; Ciftci-Yilmaz & Mittler, 2008）。

双子叶植物拟南芥 C2H2 型锌指蛋白的 C1-2i 亚家族包括 ZAT5~7、ZAT10~12、ZAT18 和 AZF1~3 等，该亚家族含有 2 个锌指结构，锌指特征序列中 2 个组氨酸之间的氨基酸数目为 3 个，大部分成员具有核定位信号及 EAR motif（ethylene-responsive element binding

factor-associated amphiphilic repression motif），主要参与各种生物和非生物胁迫响应（Lippuner et al., 1996; Meissner et al., 1997; Englbrecht et al., 2004; Sakamoto et al., 2004; Mittler et al., 2006; Liu et al., 2013; Shi et al., 2014; Yin et al., 2017）。在拟南芥中，*AtAZF2* 对盐和干旱胁迫处理均响应强烈，而 *AtAZF1* 和 *AtAZF3* 的表达对非生物胁迫（盐、干旱和冷）的响应较弱，且只有 *AtAZF2* 能够被 ABA（abscisic acid）诱导，这可能是由于 *AtAZF2* 启动子中含有 ABA 响应元件（Sakamoto et al., 2004）。过表达 *AtZAT18* 可以提高拟南芥的耐旱性，而突变 *AtZAT18* 则导致植物对干旱胁迫的耐受性降低（Yin et al., 2017）。组成型过表达 *AtZAT10* 的转基因拟南芥生长受到抑制，并对干旱、盐、高温和渗透胁迫的耐受性增强，同时也提高了 ROS 稳态相关基因如 *AtAPX1* 和 *AtAPX2* 的转录（Sakamoto et al., 2004; Mittler et al., 2006）。有趣的是，*AtZAT10* 基因敲除植株和 RNAi 干涉植株也表现出对盐和渗透胁迫的耐受性增加，但调控机制目前尚不清楚（Mittler et al., 2006）。除了拟南芥，其他双子叶植物中也有关于 C2H2 转录因子的报道。豌豆 *St*（stipules reduced）基因通过影响细胞分裂和细胞扩展调控豌豆托叶的大小（Moreau et al., 2018）。番茄基因 *H*（hair）编码 C2H2 型锌指蛋白，过表达该基因后叶片毛状体数量显著增加（Chang et al., 2018）。苜蓿 MtSUP（SUPERMAN）也是 C2H2 锌指蛋白，主要在分生组织、雄蕊、心皮边缘等部位表达，在苜蓿中将该基因突变后影响花器官的数量和形态及果实发育（Rodas et al., 2021）。

禾本科植物结缕草中的 *ZjZFN1* 基因，编码 C2H2 型锌指蛋白，其表达受盐胁迫、冷和 ABA 诱导；在拟南芥中异源过表达 *ZjZFN1* 发现，该基因通过影响活性氧的积累及盐胁迫响应基因的转录，提高拟南芥对盐胁迫的抗性（Teng et al., 2018）。干旱胁迫诱导小麦 *TaZFP1B* 的表达，而过表达 *TaZFP1B* 的小麦对干旱胁迫的抗性显著增加（Cheuk et al., 2020）。水稻中关于 C2H2 锌指蛋白也有一些文献报道，例如 ZFP182、ZFP36、ZFP179、ZFP245 和 ZFP252 等。过表达 *ZFP182* 能提高植物对盐胁迫的耐受性（Zhang et al., 2012）。过表达 *ZFP36* 能够提高抗氧化酶的活性，并增强水稻对干旱胁迫和氧化胁迫的耐受性；相反，*ZFP36* 的 RNAi 干涉植株中抗氧化酶活性较低，对干旱胁迫和氧化胁迫更敏感（Zhang et al., 2014）。过表达 *ZFP179* 能够提高水稻的耐盐性，且转基因幼苗对外源 ABA 更加敏感（Sun et al., 2010）。过表达 *ZFP252* 的植株对盐和干旱胁迫的耐受性增加，在盐和干旱胁迫处理下，过表达 *ZFP252* 植株中 *OsDREB1A*、*OsP5CS* 和 *OsProT* 等非生物胁迫相关基因的表达量高于野生型和 *ZFP252* 沉默株系，说明 *OsDREB1A*、*OsP5CS* 和 *OsProT* 可能是 *ZFP252* 的下游基因（Xu et al., 2008）。

OsZAT12 属于 C2H2 锌指蛋白的 C1-2i 亚家族，该类基因在许多代谢途径以及植物的生长发育和非生物胁迫反应中起着至关重要的作用（Ballerini et al., 2020; Yin et al., 2020; Zhang et al., 2021; Rodas et al., 2021），本实验室前期（陈宗新等，2019）克隆了 *OsZAT12* 基因，该基因在水稻根中特异表达，定位于细胞核；异源过表达 *OsZAT12* 拟南芥植株矮小，根生长受到抑制。水稻为重要的粮食作物，生物/非生物胁迫、植物激素等均影响植株发育和形态建成，进而影响产量，作为在植物生长发育和非生物胁迫中可能起着重要作用的 *OsZAT12*，其在水稻生长发育及非生物胁迫中的作用尚不清楚。因此，该文首先分析了 *OsZAT12* 的启动子元件和转录活性，采用 qRT-PCR 技术分析 *OsZAT12* 在非生物胁迫和植物激素处理下的响应模式；并利用 35S 启动子载体和 CRISPR/Cas9 基因编辑技术分别得到纯合的 *OsZAT12* 过表达植株和 *OsZAT12* 敲除植株。研究结果表明，*OsZAT12* 参与了水稻响应多种非生物胁迫和激素信号的调控，影响了水稻株型、穗型及结实率等农艺性状；为进一步研究 *OsZAT12* 参与不同非生物胁迫应答的分子机制和参与 ABA 信号转导途径的调控奠定基础。

1 材料与方法

1.1 实验材料

粳稻“中花 11”（WT），实验室自存。双元载体 pCAMBIA1301 来自本实验室，CRISPR 编辑相关载体 pYLCRISPR/Cas9Pubi-H、pYLgRNA-OsU6a/LacZ、pYLgRNA-OsU6a、pYLgRNA-OsU3/LacZ、pYLsgRNA-OsU3 由华南农业大学刘耀光实验室惠赠，大肠杆菌 DH5*a* 感受态菌种和根癌农杆菌 EHA105 感受态菌种由本实验室保存。

1.2 *OsZAT12* 及其同源基因的保守结构域分析

在 NCBI 和 TAIR 数据库中查找拟南芥和水稻中的 C1-2i 亚家族成员，并导出这些基因的氨基酸序列。利用软件 Clusatl X 1.83 进行多重序列比对，使用软件 DNAMAN 6.0 输出图片。该研究中进行多重序列比对的基因如下：*AtAZF1*（At5g67450），*AtAZF2*（At3g19580），*AtAZF3*（At5g43170），*AtZAT5*（At2g28200），*AtZAT6*（At5g04340），*AtZAT7*（At3g46090），*AtZAT10*（At1g27730），*AtZAT11*（At2g37430），*AtZAT12*（At5g59820），*AtZAT18*（At3g53600），*OsZFP252*（AAO46041.1），*OsZFP245*（AAQ95583），*OsZFP182*（NP001051718.1），*OsZFP179*（AAL76091.1），*OsZFP36*（AAP51130.1）。

1.3 OsZAT12 转录活性分析

双荧光素酶报告系统是萤火虫荧光素酶（firefly luciferase，LUC）检测系统和海肾荧光素酶（renilla luciferase，REN）检测系统的组合，常用来分析转录因子的转录活性。该研究使用拟南芥原生质体瞬时表达系统进行双荧光素酶实验，其中拟南芥原生质体的提取参考 Wu et al.（2009）的方法，双荧光素酶活性的检测根据 Promega 公司 Dual-Luciferase Reporter Assay System 试剂盒（Cat. No. E1910）中的说明书操作，并通过计算 LUC/REN 的比值分析 OsZAT12 的转录激活/抑制活性。

1.4 *OsZAT12* 启动子分析

以水稻 *OsZAT12* 基因的起始密码子（ATG）上游 2000 bp 作为研究对象，利用在线启动子分析工具 PLACE（http://www.dna.affrc.go.jp/PLACE/）和 PlantCARE（http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/plantcare/html/），对 *OsZAT12* 的启动子序列进行调控元件的预测和分析。

1.5 *OsZAT12* 基因在非生物胁迫和植物激素处理下的表达分析

1.5.1 水稻种子消毒及幼苗水培方法

水稻种子去壳后放入 50 mL 离心管中，加 75%乙醇表面消毒 1 min，后用 2.5%次氯酸钠消毒 50 min，无菌水漂洗 5 次，之后将种子置于 1/2 MS 固体培养基中培养。将以上培养 5 d 的无菌苗移至 96 孔 PCR 塑料板（剪去管底）进行水培（16 h 光照/8 h 黑暗，白天 28 ℃/夜晚 24 ℃），水稻营养液配方参照“国际水稻研究所水稻营养液”配制，5~6 d 换一次水培液。

1.5.2 非生物胁迫处理方法

取苗龄 14 d 的水稻幼苗为材料进行非生物胁迫处理。具体如下：低温胁迫，将水稻幼苗放置于 4 ℃光照培养箱（16 h 光照/8 h 黑暗）中；渗透胁迫，将水稻幼苗置于含有 20% PEG（polyethylene glycol）6000 的水稻营养液中；氧化胁迫，将水稻幼苗置于含有 20 μmol · L^{-1} 甲基紫精（methyl viologen，MV）的水稻营养液中；盐胁迫处理，将水稻幼苗置于含有 100 mmol · L^{-1} NaCl 的水稻营养液中。分别收取处理 0、0.5、1、3、6、12、24、48 h 的整株幼苗，未处理材料同时取样作为对照组，所有样品于液氮速冻后-80 ℃保存备用。除低温处理外，其他胁迫处理均在植物培养室（16 h 光照/8 h 黑暗，白天 28 ℃/夜晚 24 ℃）进行。

1.5.3 植物激素处理方法

取苗龄 14 d 的水稻幼苗为材料进行植物激素处理。在培养液中分别添加 100 μmol · L^{-1} ABA（abscisic acid），1 μmol · L^{-1} 24-eBL（2,4-epibrassinolide），1 μmol · L^{-1} IAA（indole-3-acetic acid），处理 0、1、24、48 h 后取材（取整株幼苗），未处理材料同时取样作为对照组，所

有样品于液氮速冻后-80 ℃保存。激素处理的材料均放在植物培养室（16 h 光照/8 h 黑暗，白天 28 ℃/夜晚 24 ℃）。

1.5.4 水稻 RNA 的提取及 cDNA 第一条链的合成

RNA 提取根据华越洋超快型植物 RNA 提取试剂盒（Cat. No. 0416-50）的说明书进行。参照 Toyobo 反转录试剂盒（Cat. No. FSQ-301）说明书进行 cDNA 第一条链的合成。

1.5.5 *OsZAT12* 基因的 qRT-PCR（quantitative real-time PCR）检测

该研究中的 qRT-PCR 采用 SYBR 染料法（GenStar 2 × RealStar Green Fast Mixture, Cat. No. A301-10）。以水稻 *eEF-1a* 基因为内参（qPCR-eEF-1a-F: 5’-GCACGCTCTTCTTGCTTTC-3’; qPCR-eEF-1a-R: 5’-AGGGAATCTTGTCAGGGTTG-3’），采用 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 法计算（Livak & Schmittgen, 2001）*OsZAT12* 基因的相对表达量（qPCR-OsZAT12-F: 5’-GACCTGAACCATCCACCCTG-3’; qPCR-OsZAT12-R: 5’-CGGTATCCAAGAACTGGTGGAA-3’）。

1.6 *OsZAT12* 基因过表达载体和 CRISPR/Cas9 载体构建

由于 *OsZAT12* 在水稻根中特异表达（陈宗新等，2019），因此以野生型水稻根的 cDNA 为模板，利用引物 OsZAT12-F: 5’-CGGGATCCATGAAGAGGTTTGCA-3’（酶切位点 *Bam*H I），OsZAT12-R: 5’-AACTGCAGCTAGTAGCCGACGCA-3’（酶切位点 *Pst* I）扩增 *OsZAT12* 基因，构建到 pCAMBIA1301 载体上，得到过表达载体 pCAMBIA1301::35S::*OsZAT12*。

利用华南农业大学刘耀光实验室设计的网站 CRISPR-GE（http://skl.scau.edu.cn/）设计 *OsZAT12* 敲除靶点。为提高敲除效率，采用双靶点载体的策略，因此 *OsZAT12* 基因设计两个靶点，其中靶点 5’-CATGAGGCGCCACCGCGCCA-3’ 以 U6 为启动子，靶点 5’-TGCGACGACATGAGCATCAG-3’以 U3 为启动子，具体载体构建参考 Ma et al.（2015）。

1.7 *OsZAT12* 基因遗传转化水稻及转基因植株鉴定

将 1.6 中构建好的重组载体（过表达载体和 CRISPR/Cas9 载体）转化至根癌农杆菌 EHA105 感受态细胞中。利用农杆菌介导的遗传转化法将重组载体转进水稻愈伤组织中，具体方法参考李美茹和李洪清（2003）和王亚琴等（2011）。

转基因植株的鉴定采用 PCR 方法。剪取 T_1 代幼苗约 2 cm 长的叶片，利用 TPS 溶液（100 mmol · L^{-1} Tris-HCl, pH 8.0; 10 mmol · L^{-1} EDTA-Na_2, pH 8.0; 1 mol · L^{-1} KCl）提取 DNA。过表达 *OsZAT12* 的转基因植株利用抗性筛选标记基因 *HptII*（hygromycin phosphotransferase II）设计引物 Hyg-F: 5’-GATGTTGGCGACCTCGTATT-3’, Hyg-R: 5’-TCGTTATGTTTATCGGCACTTT-3’，以 DNA 为模板进行 PCR 扩增检测。CRISPR 植株采用引物 CRISPR-F: 5’-TCAGACAACAGAGAGGTTGGT-3’和 CRISPR-R: 5’-TAGTAGCCGACGCAGTCAAC-3’扩增 *OsZAT12* 包括靶位点在内的片段，经测序后检测突变位点。

1.8 转基因水稻幼苗对外源 ABA 的敏感性分析

取野生型、过表达 *OsZAT12* 和敲除 *OsZAT12* 植株的种子，经表面消毒后播种于含不同浓度 ABA（0、1、5、10 μmol · L^{-1}）的 1/2 MS 培养基上，每个株系在不同 ABA 浓度培养基上播种 30 粒种子，在植物培养室（16 h 光照/8 h 黑暗，白天 28 ℃/夜晚 24 ℃）培养 10 d 后拍照并统计株高和根长。

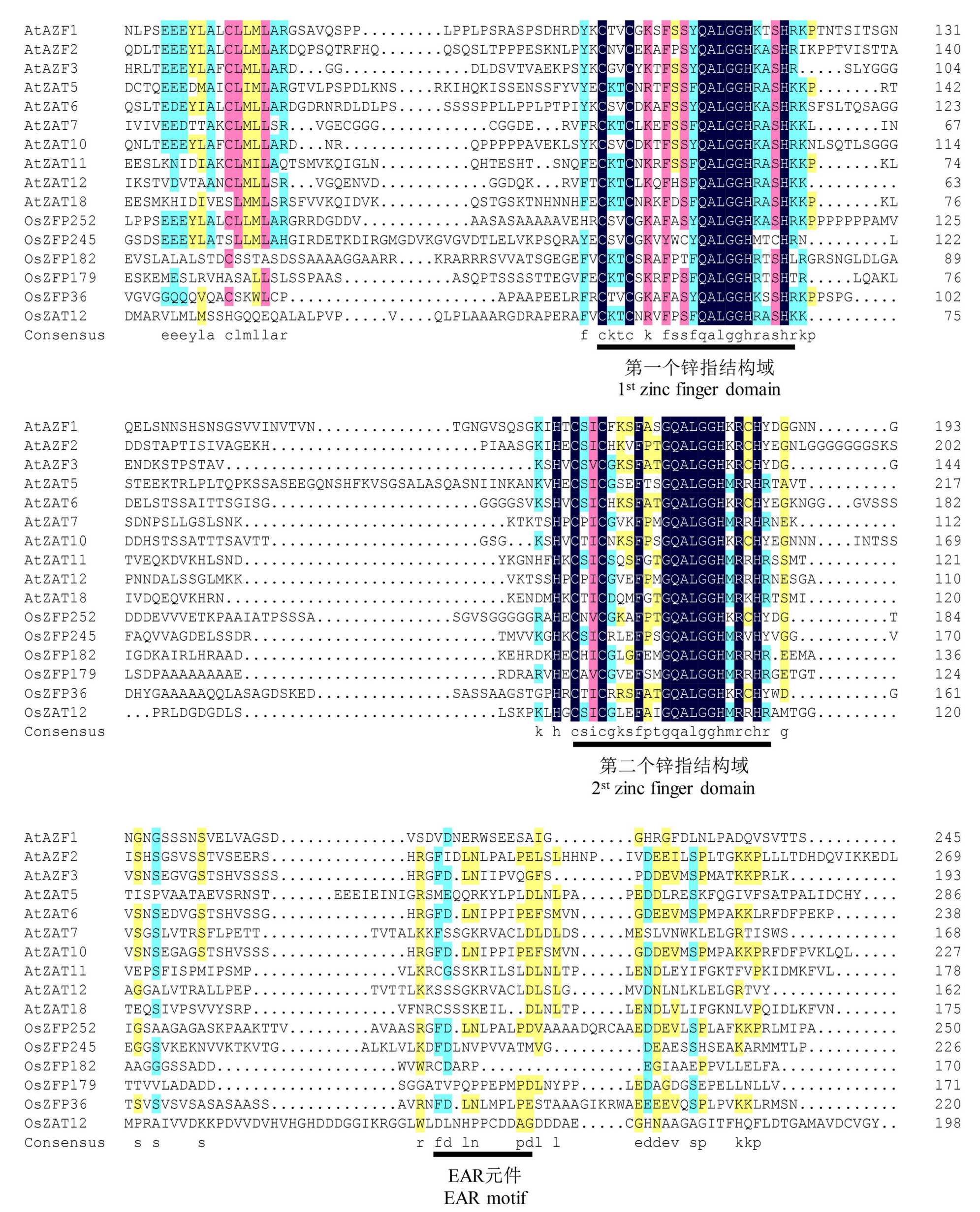
1.9 数据分析

所有实验均进行 3 次生物学重复，每次重复中每个样品设置 3 个技术重复。数据统计为平均值±标准偏差。利用软件 SPSS Statistics 中的单因素方差分析进行数据的显著性分析（* $P< 0.05$；** $P < 0.01$）。

2 结果与分析

2.1 转录因子 OsZAT12 保守结构域的分析

OsZAT12（Os05g0114400）基因编码区全长 597 bp，该基因不含内含子，编码 198 个氨基酸（陈宗新等，2019）。为进一步研究 OsZAT12 蛋白结构域的保守性及其序列特点，对拟南芥和水稻 C1-2i 亚家族中的部分成员进行了多重序列比对。结果如图 1 所示，OsZAT12 的结构域与拟南芥和水稻中的同源蛋白一致，均含有两个包含 QALGGH 保守序列的锌指结构域以及一个 EAR motif（ethylene-responsive element binding factor-associated amphiphilic repression motif）。而蛋白 C 末端的 EAR motif 通常被认为具有抑制活性（Meissner & Michael, 1997; Englbrecht et al., 2004; Ciftci-Yilmaz & Mittler, 2008）。以上结果说明 OsZAT12 是一个典型的 C2H2 型锌指蛋白，属于 C1-2i 亚家族，可能具有转录抑制活性。



黑色部分表示相似性=100%，粉色部分表示相似性在 75%~100%之间（不包括 100%），蓝色部分表示相似性在 50%~75%之间（不包括 75%），黄色部分表示相似性在 33%~50%之间（不包括 50%），白色部分表示相似性低于 33%。

The black part indicates similarity = 100%, the pink part indicates similarity between 75% and 100% (excluding 100%), the blue part indicates similarity between 50% and 75% (excluding 75%), the yellow part indicates

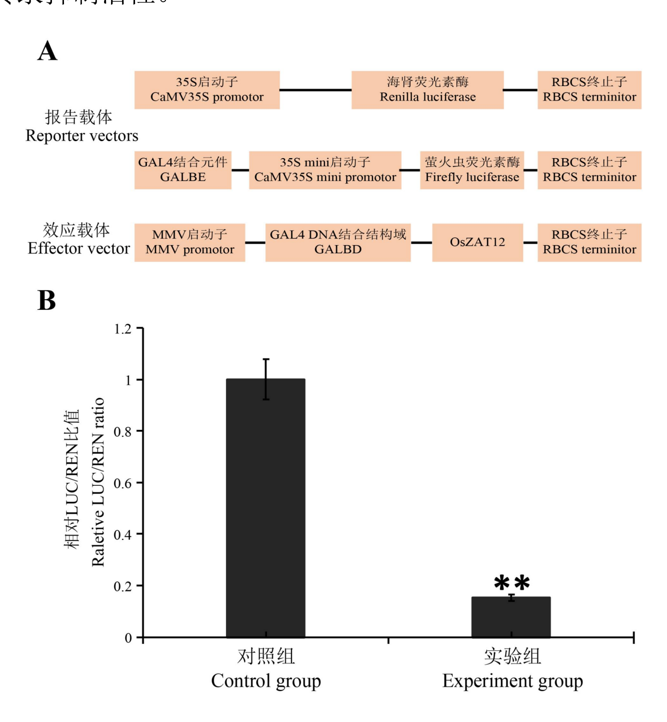
similarity between 33% and 50% (excluding 50%), the white part indicates similarity <33%.

图 1　水稻和拟南芥 C2H2 型锌指蛋白氨基酸序列的多重比对

Fig. 1　Alignment of amino acid sequences of selected C2H2 zinc finger proteins in *Oryza sativa* and *Arabidopsis thaliana*

2.2　转录因子 OsZAT12 的转录活性分析

该研究采用双荧光素酶报告系统检测 OsZAT12 的转录活性，将 *OsZAT12* 与包含 GAL4 DNA 结合结构域（GAL4 DNA binding domain，GALBD）的效应载体融合（图 2:A），同时与携带荧光素酶基因的报告载体共同转化拟南芥原生质体，检测对照组和实验组的萤火虫荧光素酶（firefly luciferase，LUC）活性和海肾荧光素酶（firefly luciferase，REN）活性并计算 LUC/REN 值。结果发现，实验组的 LUC/REN 值显著低于对照组（图 2:B），表明转录因子 OsZAT12 具有转录抑制活性。



A. 双荧光素酶实验载体构建示意图，其中 GALBE（GAL4 binding element）是 GAL4 结合元件，GALBD（GAL4 DNA binding domain）是 GAL4 DNA 结合结构域，35S mini 启动子是只含 46 bp 的 35S 启动子；B. 双荧光素酶报告系统检测 OsZAT12 的转录活性；报告载体和效应空载体作为对照组（control group），报告载体和连有 *OsZAT12* 的效应载体作为实验组（experiment group）；实验结果为三次生物学重复的平均值±标准偏差。对照组的 LUC/REN 比值设为 1，**表示与对照相比达到极显著水平（P<0.01）。

A. schematic structures of plasmids used in dual-luciferase assay, GALBE is GAL4 binding element, GALBD is GAL4 DNA binding domain, and -46 35S mini promoter indicates that 35S promoter only contains 46 bp; **B**. the dual luciferase reporter system detects the transcriptional activity of OsZAT12; the reporter and effector vectors serve as control group, the reporter vectors and the effector vector with *OsZAT12* were used as the experimental group; values are the means ± SD from three biological replicates. The LUC/REN ratio of control was defined as 1, ** indicates a significant difference at $P < 0.01$.

图 2　OsZAT12 的转录活性分析

Fig. 2　Transcriptional activity analysis of OsZAT12

2.3 *OsZAT12* 启动子的序列分析

以水稻 *OsZAT12* 基因的起始密码子（ATG）上游 2 000 bp 作为研究对象，使用启动子在线分析网站对 *OsZAT12* 启动子进行调控元件预测。结果显示 *OsZAT12* 启动子上调控元件非常丰富，除了基本的核心启动子元件（TATA box 和 CAAT box 元件），该段序列中还具有非生物胁迫和激素相关的顺式作用元件。其中与非生物胁迫相关的有 2 个 MYB 转录因子结合元件；与激素相关的元件包括 3 个 GA 响应元件、3 个 ABA 响应元件、2 个 Auxin 响应元件和 1 个 JA 响应元件等（图 3）。推测 *OsZAT12* 基因的表达可能受非生物胁迫因子和多种激素的调节。

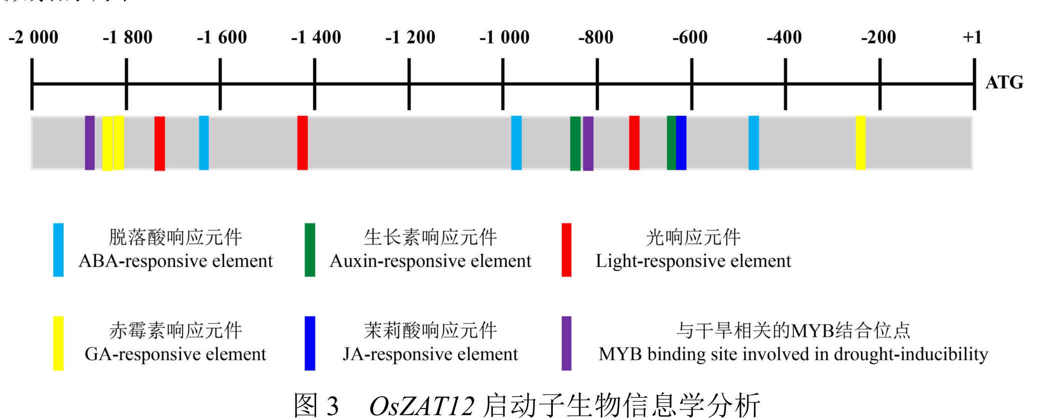
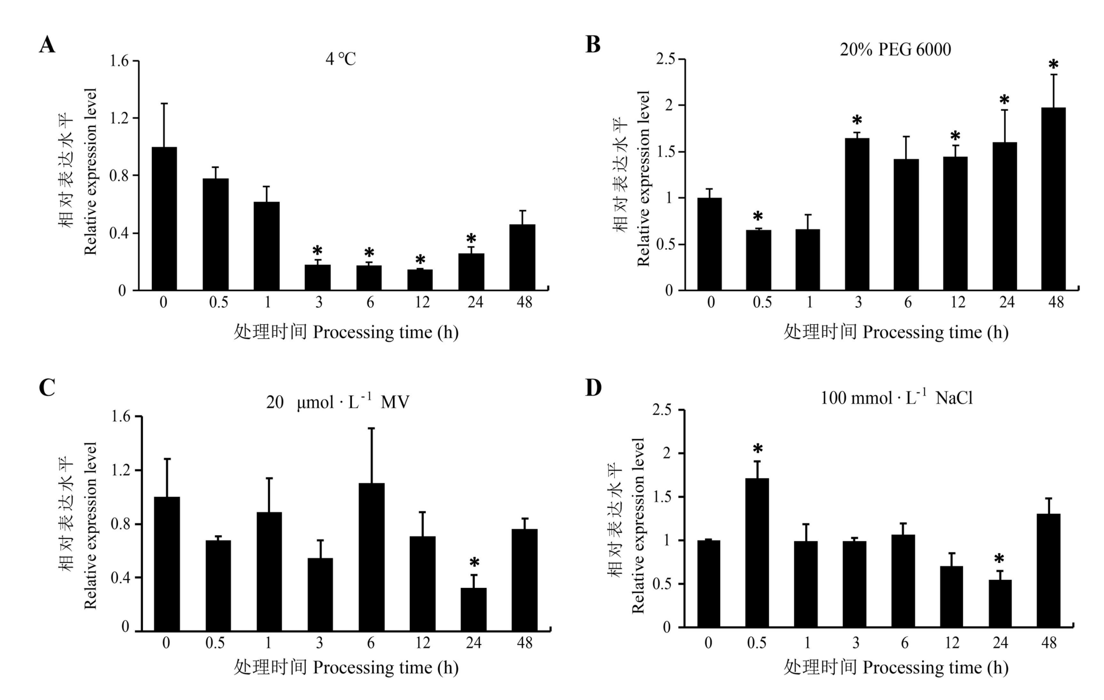


图 3　*OsZAT12* 启动子生物信息学分析

Fig. 3　Bioinformatics analysis of *OsZAT12* promoter

2.4 非生物胁迫处理下 *OsZAT12* 的表达分析

拟南芥 *ZAT12* 在活性氧以及非生物胁迫信号传导中起着重要的作用（Davletova et al., 2005）。水稻 *OsZAT12* 启动子中含有非生物胁迫相关的元件（图 3），推测其可能响应非生物胁迫。于是进一步检测了水稻幼苗在低温（4 ℃）、渗透胁迫（20% PEG 6000）、氧化胁迫（20 μmol · L^{-1} MV）和盐胁迫（100 mmol · L^{-1} NaCl）处理下 *OsZAT12* 的表达。如图 4:A 所示，低温处理 48 h 内，*OsZAT12* 的表达均呈下调趋势，其中在处理 12 h 时 *OsZAT12* 的表达量降到最低，之后略微上调。在渗透胁迫处理下，*OsZAT12* 表达量呈先下降后上升的趋势，从 3 h 上升一直到 48 h，*OsZAT12* 的表达量达到未处理时的 2 倍左右（图 4:B）。然而，在 20 μmol · L^{-1} MV 和 100 mmol · L^{-1} NaCl 的处理下，*OsZAT12* 的表达量随时间变化未出现明显的上调或下调趋势（图 4:C, D）。以上结果表明 *OsZAT12* 基因的表达响应多种非生物胁迫，且随胁迫时间的延长其表达量出现不同的变化趋势。



A. *OsZAT12* 在 4 ℃胁迫处理下的表达量分析；**B.** *OsZAT12* 在 20% PEG 胁迫处理下的表达量分析；**C.** *OsZAT12* 在 20 μmol · L-1 MV 胁迫处理下的表达量分析；**D.** *OsZAT12* 在 100 mmol · L-1 NaCl 胁迫处理下的表达量分析。每组处理 0 h 的相对表达量分别设为 1，*表示与对照相比达到显著水平（$P<0.05$）。

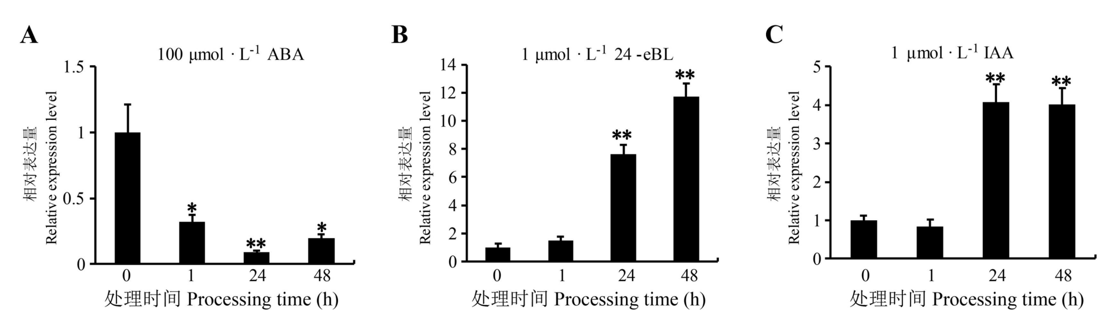
A. Expression level of *OsZAT12* under 4℃ treatment; **B**. Expression level of *OsZAT12* under 20% PEG treatment; **C**. Expression level of *OsZAT12* under 20 μmol · L-1 MV treatment; **D**. Expression level of *OsZAT12* under 100 mmol · L-1 NaCl treatment. The relative expression level of 0 h after each treatment was defined as 1, * indicate a significant difference at $P < 0.05$.

图 4　不同非生物胁迫下 *OsZAT12* 的表达水平

Fig. 4　Expression level of *OsZAT12* under abiotic stresses

2.5 不同植物激素处理下 *OsZAT12* 的表达分析

植物激素作为植物内源信号分子，在植物生长发育过程中起着重要的作用。*OsZAT12* 的启动子中含有多个激素相关元件（图 3），推测其可能响应激素水平的变化。植物激素处理实验结果表明，外施 ABA 显著下调 *OsZAT12* 的表达。处理 1 h 时 *OsZAT12* 的表达量迅速下降，在 24 h 降到最低，约为对照的 0.1 倍，48 h 时略有升高（图 5:A）。相反，外施 1 μmol · L-1 的 24-eBL，在 1 h 时 *OsZAT12* 表达开始上调，一直持续到 48 h 并达到最高，为对照的 12 倍（图 5:B）。IAA 处理也能上调 *OsZAT12* 的表达，其表达量在 24 h 达到最高，一直持续到 48 h（图 5:C）。这些结果说明 *OsZAT12* 对不同植物激素的响应各异，可能参与不同植物激素信号对水稻生长发育的调控。



A. *OsZAT12* 在 100 μmol · L-1 ABA 处理下的表达量分析；**B.** *OsZAT12* 在 1 μmol · L-1 24-eBL 处理下的表达

量分析；**C.** *OsZAT12* 在 1 μmol·L^{-1} IAA 处理下的表达量分析。每组处理 0 h 的相对表达量分别设为 1，* 表示与对照相比达到显著水平（*P*<0.05），**表示与对照相比达到极显著水平（*P*<0.01）。

A. Expression level of *OsZAT12* under 100 μmol·L^{-1} ABA treatment; **B**. Expression level of *OsZAT12* under 1 μmol·L^{-1} 24-eBL treatment; **C**. Expression level of *OsZAT12* under 1 μmol·L^{-1} IAA treatment. The relative expression level of 0 h after each treatment was defined as 1, * and ** indicate a significant difference at $P < 0.05$ and $P < 0.01$, respectively.

图 5 不同植物激素对 *OsZAT12* 的表达水平

Fig. 5 Expression level of *OsZAT12* under different phytohormones treatments

2.6 *OsZAT12* 转基因植株的获得

2.6.1 *OsZAT12* 敲除植株的筛选

使用特异检测引物（CRISPR-F 和 CRISPR-R）对 *OsZAT12* 敲除植株的基因组 DNA 进行 PCR 扩增，然后对得到的单一 PCR 片段产物进行测序。结果得到了三个敲除 *OsZAT12* 的纯合株系，其中 *oszat12-12-3* 和 *oszat12-8-15* 株系均为单碱基插入，而 *oszat12-10-10* 株系则是缺失一段序列（图 6）。

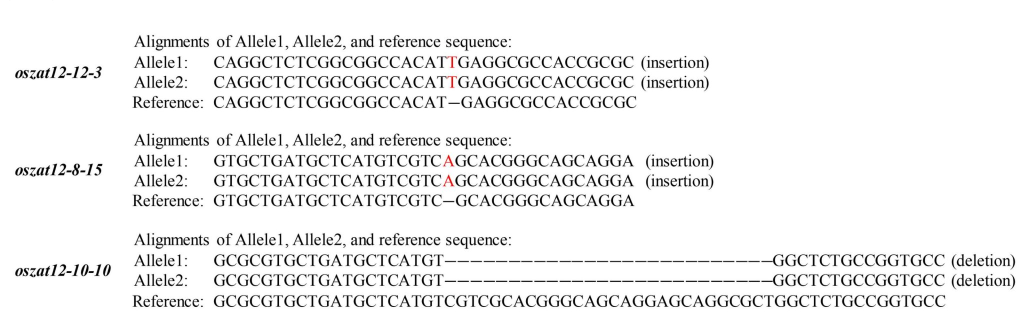
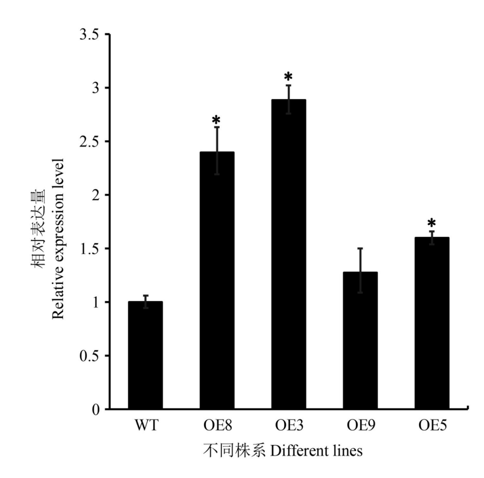


图 6 不同 *OsZAT12* 敲除株系的测序结果

Fig. 6 Sequencing results of *OsZAT12* knockout lines

2.6.2 *OsZAT12* 过表达植株的表达量检测

同时，获得 4 个过表达 *OsZAT12* 纯合株系，分别命名为 OE8、OE3、OE9 和 OE5。qRT-PCR 结果（图 7）显示，与野生型相比，过表达株系 OE8、OE3 和 OE5 的表达量显著提高，而 OE9 的表达量有所提高，但与野生型无显著差异。于是该研究选取 OE8 和 OE3 用于后续研究。



WT 中 *OsZAT12* 基因的相对表达量设为 1，*表示与对照相比达到显著水平（*P*<0.05）。

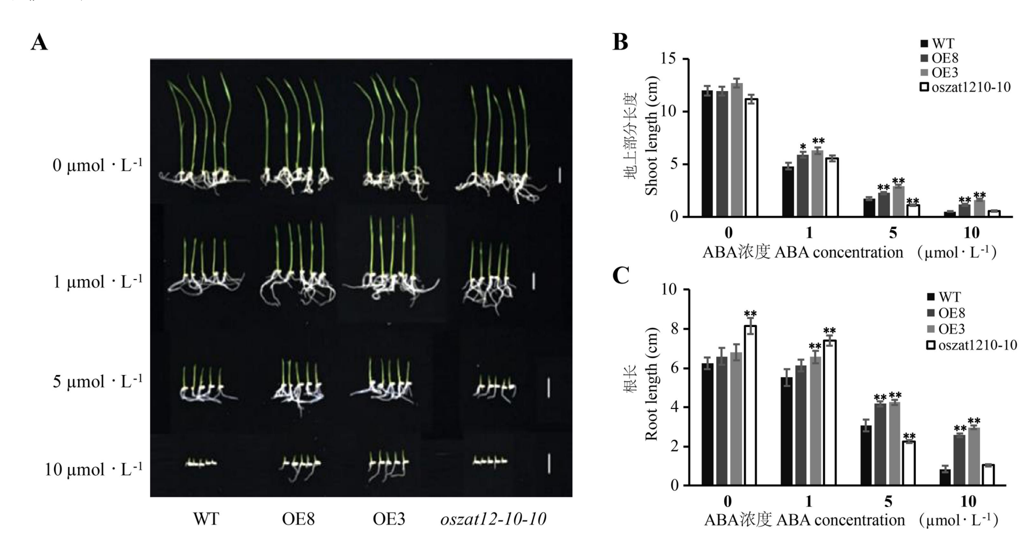
Relative expression level of *OsZAT12* in WT was defined as 1, * indicates a significant difference at $P < 0.05$.

图 7　转基因植株中 *OsZAT12* 基因的 qRT-PCR 分析

Fig.7　qRT-PCR analysis of *OsZAT12* expression in transgenic plants

2.7 *OsZAT12* 转基因水稻对 ABA 的敏感性分析

ABA 作为胁迫激素，是植物响应生物/非生物胁迫的重要调控因子（Chen et al., 2020; Bharath et al., 2021）。*OsZAT12* 启动子序列中包含三个 ABRE（ABA responsive element）(图 3)，且 ABA 有抑制 *OsZAT12* 表达的作用(图 5:A)。在获得过表达 *OsZAT12* 和敲除 *OsZAT12* 的植株后，进一步检测其对 ABA 的敏感性。结果表明，ABA 抑制了野生型和 *OsZAT12* 超表达幼苗的生长，且随着 ABA 浓度的升高，抑制程度越大，但 *OsZAT12* 过表达株系的株高、根长都显著高于野生型（图 8)。*OsZAT12* 敲除植株的株高在 5 μmol·L^{-1} ABA 处理下显著低于野生型；低浓度 ABA（1 μmol·L^{-1}）处理下，其根长显著高于野生型，但在较高浓度 ABA（10 μmol·L^{-1}）处理下，根长与野生型无显著差异（图 8)。以上结果表明过表达 *OsZAT12* 会降低水稻对ABA的敏感性，而敲除 *OsZAT12* 则在合适的ABA浓度下才会增强水稻对ABA的敏感性。



A. *OsZAT12* 转基因水稻在不同浓度外源 ABA 处理下的表型，标尺=2 cm；**B.** *OsZAT12* 转基因水稻在不同浓度外源 ABA 处理下的株高；**C.** *OsZAT12* 转基因水稻在不同浓度外源 ABA 处理下的根长。OE8、OE3 为 *OsZAT12* 过表达株系；*oszat12-10-10* 为 *OsZAT12* 敲除植株。*表示与 WT 相比达到显著水平（P<0.05)；**表示与 WT 相比达到极显著水平（P<0.01），n=30。

A. the phenotype, **B**. shoot length and **C**. the root length of *OsZAT12* transgenic rice under different concentrations of exogenous ABA treatment, scale bar=2 cm. OE8 and OE3 are OsZAT12 overexpression lines; *oszat12-12-3*, *oszat12-10-10*, and *oszat12-8-15* are *OsZAT12* knockout plants. * and ** indicate a significant difference at P < 0.05 and P < 0.01, respectively; n = 30.

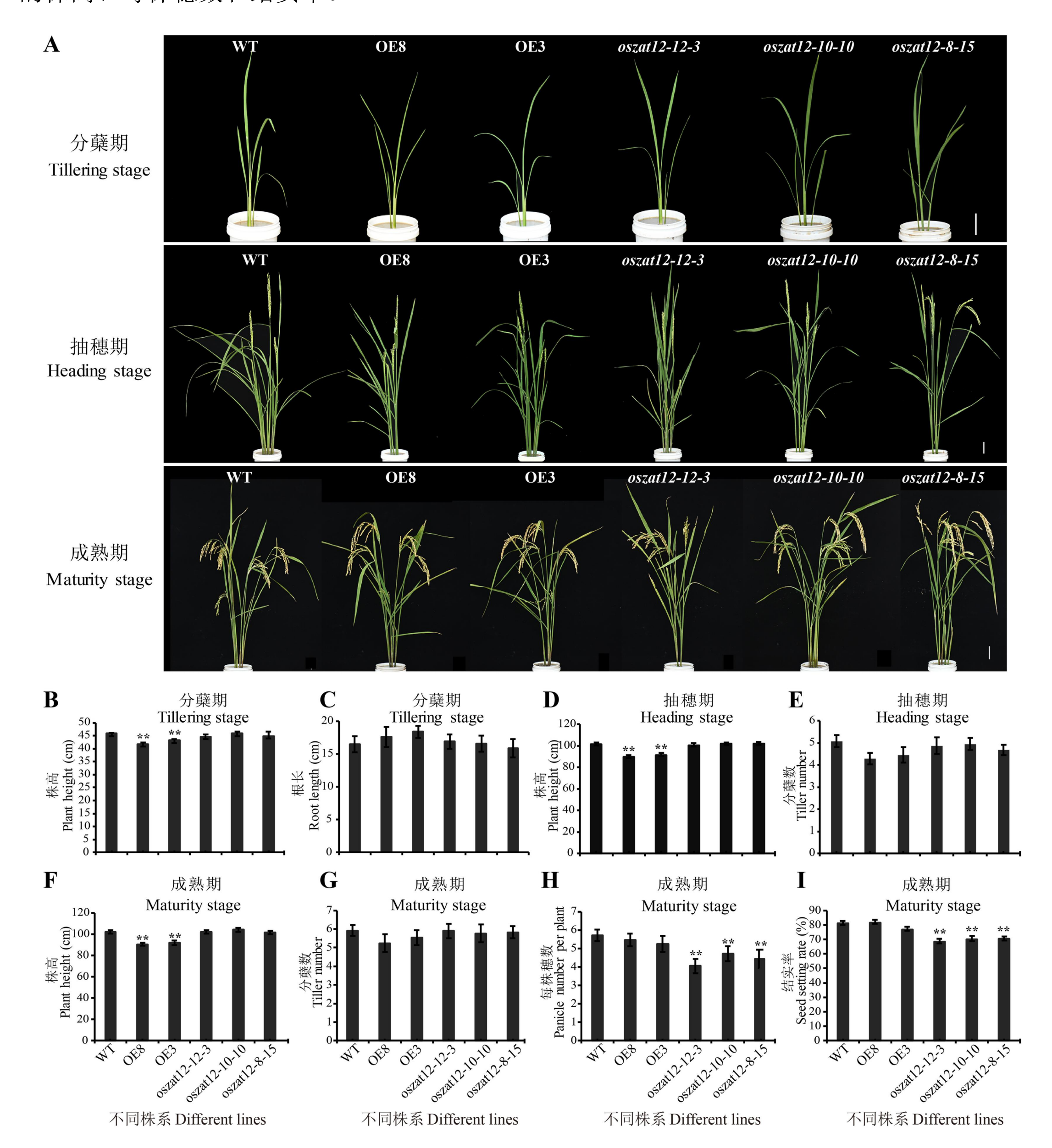
图 8　*OsZAT12* 转基因水稻幼苗对 ABA 的敏感性分析

Fig. 8　Sensitivity analysis of *OsZAT12* transgenic rice seedlings to ABA

2.8 *OsZAT12* 转基因植株农艺性状的观察与统计

农艺性状的统计分析结果表明，在分蘖期、抽穗期、成熟期这三个时期中，*OsZAT12* 过表达水稻的株高均显著低于野生型，*OsZAT12* 敲除植株则与野生型没有显著差异（图 9:A, B, D, F)；根长和分蘖数这两个指标，无论是 *OsZAT12* 过表达还是敲除植株，均与野生型并无显著差异(图 9:C, E, G)。*OsZAT12* 敲除植株的每株穗数和结实率均显著低于野生型，

而 *OsZAT12* 过表达株系与野生型无显著差异（图 9:H, I）。以上结果表明 *OsZAT12* 影响水稻的株高、每株穗数和结实率。



A. *OsZAT12* 转基因水稻分蘖期、抽穗期和成熟期的表型，标尺=5 cm；**B–C.** *OsZAT12* 转基因水稻分蘖期的株高和根长；**D–E.** *OsZAT12* 转基因水稻抽穗期的株高和分蘖数；**F–I.** *OsZAT12* 转基因水稻成熟期的株高、分蘖数、每株穗数和结实率。OE8 和 OE3 为 *OsZAT12* 过表达株系；*oszat12-12-3*、*oszat12-10-10* 和 *oszat12-8-15* 为 *OsZAT12* 敲除植株。*表示与 WT 相比达到显著水平（P<0.05）；**表示与 WT 相比达到极显著水平（P<0.01），n=30。

A. Ehenotype of *OsZAT12* transgenic rice at tillering stage, heading stage and maturity stage, scale bar = 5 cm; **B–C**. Plant height and root length of *OsZAT12* transgenic rice at tillering stage; **D–E**. Plant height and and tiller number of *OsZAT12* transgenic rice at heading stage; **F–I**. Plant height, tiller number, panicle number per plant and seed setting rate of *OsZAT12* transgenic rice at maturity stage. OE8 and OE3 are *OsZAT12* overexpression lines; *oszat12-12-3*, *oszat12-10-10*, and *oszat12-8-15* are *OsZAT12* knockout plants. * and ** indicate significant differenceS at $P < 0.05$ and $P < 0.01$, respectively; $n = 30$.

图 9　野生型和 *OsZAT12* 转基因水稻的农艺性状考察

Fig. 9 Agronomic traits of *OsZAT12* transgenic rice and wide type

3 讨论与结论

锌指蛋白是真核生物体内一类重要的转录调控因子家族，其中 C2H2 型锌指蛋白是最常见的一类（Takatsuji, 1999）。C2H2 型锌指蛋白通常包含 1~6 个锌指结构域，且在锌指结构的 α-螺旋中含有 QALGGH 保守序列（Sakamoto et al., 2000; Englbrecht et al., 2004; Ciftci-Yilmaz & Mittler, 2008; Wang et al., 2019）。该文研究发现水稻 OsZAT12 具有两个典型的 C2H2 锌指结构和一个 EAR motif，并与拟南芥 ZAT12 有较高的同源性，说明 OsZAT12 属于水稻 C2H2 锌指蛋白家族成员。大多数含有 EAR motif 的锌指蛋白都表现出转录抑制活性（Ohta et al., 2001），例如矮牵牛 *ZPT2-3* 的瞬时表达分析表明其起着阻遏物的作用（Sugano et al., 2003），而含有 EAR motif like 的拟南芥 *ZAT12*，在响应冷胁迫时可能作为 AtCBF 转录因子的抑制子起作用（Vogel et al., 2005）。该文研究结果也表明水稻 OsZAT12 蛋白具有转录抑制活性，是一个有功能的转录抑制因子。

植物 C2H2 型锌指蛋白作为一类重要的转录因子，是目前研究较为深入的一类锌指蛋白。该类转录因子在植物生长发育和响应非生物胁迫中起着重要的调控作用（Sakamoto et al., 2004; Davletova et al., 2005; Mittler et al., 2006; Rossel et al., 2007; Xie et al., 2012; Shi et al., 2014; Chen et al., 2016; Yin et al., 2017; Ballerini et al., 2020; Yin et al., 2020; Zhang et al., 2021; Rodas et al., 2021）。油菜 BnLATE（Late flowering）通过限制油菜角果中木质素的聚合减少角果的破裂（Tao et al., 2017）。水稻 *NSG1* 基因编码 C2H2 型锌指蛋白，与拟南芥 *SUP*（*SUPERMAN*）、*JAG*（*JAGGED*）和 *NUB*（*NUBBIN*）及水稻 *SL1*（*STAMENLESS1*）的功能类似，参与调控水稻花发育（Dinneny et al., 2004; Ohno et al., 2004; Xiao et al., 2009; Zhuang et al., 2020）。组成型过表达 *AtZAT10* 的转基因拟南芥表现为生长阻滞（Sakamoto et al., 2004; Mittler et al., 2006）。本实验室前期研究（陈宗新等，2019）也发现异源过表达 *OsZAT12* 拟南芥植株矮小，根生长受到抑制。与异源转化 *OsZAT12* 的拟南芥表型相似，该研究也发现过表达 *OsZAT12* 水稻植株在分蘖期、抽穗期和成熟期的株高均显著降低。该类表型都类似于拟南芥或水稻等植株遭遇胁迫后或过表达胁迫相关转录因子如 *DREB1* 植株的表型（Kasuga et al., 1999），说明 *OsZAT12* 可能为胁迫相关基因。

植物对非生物胁迫的耐受性，主要依赖于激活植物体内与胁迫相关的分子调控网络，包括信号刺激的应答、激素信号转导途径、诱导信号通路基因的表达等（Dansana et al., 2014; Lima et al., 2015）。冷胁迫会对植物造成损伤，严重时可使植物死亡（Wang et al., 2017）。C2H2 锌指蛋白可通过直接调控下游冷胁迫相关基因来增强植物的抗寒能力（Han et al., 2020）。番茄 *SlCZFP1* 基因通过诱导 *COR*（cold-regulated）或冷响应相关基因的组成型表达，增强转基因拟南芥和水稻的耐寒性（Zhang et al., 2011）。大豆 *GmZF1* 通过结合 *COR6.6* 启动子区并上调该基因的表达，调节转基因拟南芥对冷胁迫的抗性（Yu et al., 2014）。在香蕉中，过表达 *MaC2H2-2* 和 *MaC2H2-3* 显著抑制 *MaICE1*（inducer of CBF expression，冷信号传导途径的一个关键组成部分）的转录；因此，*MaC2H2s* 可能通过抑制 *MaICE1* 的转录来增强香蕉的抗寒性（Han & Fu, 2019）。低温处理上调拟南芥 *ZAT12* 的表达（Davletova et al., 2005），过表达该基因则下调 *CBF*（CRT/DRE binding factor）基因的表达，表明 *ZAT12* 负调控拟南芥对冷胁迫的适应（Vogel et al., 2005）。该文研究则表明，4 ℃下调 *OsZAT12* 的表达，这说明 *ZAT12* 在拟南芥和水稻中对低温胁迫的响应模式不同，这暗示两者的功能可能不同。许多非生物胁迫（如盐、冷和干旱）可诱发植物产生渗透胁迫（Han et al., 2020）。渗透胁迫导致植物生理干旱、离子失衡、氧化损伤和生长抑制（Yamaguchi-Shinozaki & Shinozaki, 2006）。拟南芥 *ZAT10* 在渗透胁迫处理后表达显著上调，尤其在叶片中；过表达 *ZAT10* 拟南芥和 *zat10*

突变体均表现出对渗透胁迫的耐受性增强（Mittler et al., 2006）。在拟南芥中，ZAT10 被认为是渗透胁迫的正调控因子并受 MAP 激酶的调控（Nguyen et al., 2016）。杨树中鉴定出 16 个 C1-2i 亚家族成员，其中 6 个成员参与了渗透胁迫（Gourcilleau et al., 2011）。在拟南芥中异源过表达大豆 *GmZAT4*，该基因可通过 ABA 途径提高拟南芥对 20% PEG 6000 的耐受性（Sun et al., 2019）。在水稻中，20% PEG 6000 处理后 *RZF71* 的表达显著上调，表明该基因在渗透胁迫反应中发挥重要作用（Guo et al., 2007）。与拟南芥 *ZAT10* 和水稻 *RZF71* 的表达模式不同，该文研究发现，在 20% PEG 6000 的渗透胁迫处理过程中，*OsZAT12* 的表达先下降，随后逐渐转变为上调趋势。综合以上结果说明 *OsZAT12* 的表达受到非生物胁迫（如低温或渗透胁迫）的调控，推测 *OsZAT12* 参与了水稻响应非生物胁迫的过程。

该研究对水稻 *OsZAT12* 启动子分析发现其中含有激素相关元件，有趣的是，*OsZAT12* 的表达在 24-eBL、IAA 处理后上调，推测 *OsZAT12* 也参与了不同激素信号途径。ABA 是植物非生物胁迫中一个重要的调控因子，因其广泛在干旱、寒冷、高温、盐胁迫和水涝等逆境中起着重要的作用，被称为胁迫激素（Chen et al., 2020; Bharath et al., 2021）。水稻 C1-2i 亚家族成员的 *ZFP179*，ABA 处理 3 h 后其表达上调，随后下调，至 24 h 时达到最高（Sun et al., 2010）。而该研究却发现，ABA 显著下调 *OsZAT12* 的表达，说明两者在 ABA 信号传导途径中的功能可能存在不同。过表达 *ZFP179* 基因的水稻幼苗表现增加对 ABA 的敏感性（Sun et al., 2010）。而该研究则发现过表达 *OsZAT12* 降低了水稻对 ABA 处理的敏感性。过表达 *OsZAT12* 水稻幼苗和过表达 *ZFP179* 水稻幼苗对外源 ABA 敏感性的差异可能与这两个基因对 ABA 的响应模式不同有关。有趣的是，*OsZAT12* 敲除植株的株高只有在 5 μmol · L^{-1} ABA 处理下显著低于野生型；而在正常条件及低浓度 ABA（1 μmol · L^{-1}）处理下，根长显著高于野生型；在较高浓度 ABA（10 μmol · L^{-1}）处理下，根长与野生型无显著差异。我们推测，敲除 *OsZAT12* 后可能会降低植株内源 ABA 含量，只有外施合适浓度的 ABA 时，敲除 *OsZAT12* 植株才会表现出对 ABA 的敏感性增强，这与 *osbglu33* 水稻突变体及过表达 *ZmWRKY114* 的水稻植株对外源 ABA 的响应方式相似（Ren et al., 2019; Bo et al., 2020）。结合 *OsZAT12* 对非生物胁迫（低温胁迫和渗透胁迫）及胁迫激素 ABA 的响应模式，推测 *OsZAT12* 参与调节非生物胁迫及激素信号途径，进而影响了水稻株型的发育，并且在水稻穗型及结实中也起着重要的调控作用。进一步深入研究 *OsZAT12* 如何参与植物不同非生物胁迫应答的分子机制和 ABA 信号转导途径的调控，将为利用 *OsZAT12* 进行水稻耐逆稳产分子设计育种提供实验依据。

参考文献：

BALLERINI ES, MIN Y, EDWARDS MB, et al., 2020. POPOVICH, encoding a C2H2 zinc-finger transcription factor, plays a central role in the development of a key innovation, floral nectar spurs, in *Aquilegia*[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 117(36): 22552-22560.

BHARATH P, GAHIR S, RAGHAVENDRA AS, 2021. Abscisic acid-induced stomatal closure: an important component of plant defense against abiotic and biotic stress[J]. Front Plant Sci, 12: 615114.

BO C, CHEN H, LUO G, et al., 2020. Maize *WRKY114* gene negatively regulates salt-stress tolerance in transgenic rice[J]. Plant Cell Rep, 39(1): 135-148.

CHANG J, YU T, YANG Q, et al., 2018. Hair, encoding a single C2H2 zinc-finger protein, regulates multicellular trichome formation in tomato[J]. Plant J, 96(1): 90-102.

CHEN J, YANG L, YAN X, et al., 2016. Zinc-finger transcription factor ZAT6 positively regulates cadmium tolerance through the glutathione-dependent pathway in Arabidopsis[J]. Plant Physiol,

171(1): 707-719.

CHEN ZX, CHEN JF, WANG YQ, 2019. A preliminary study of OsZAT12 with C2H2-type zinc finger transforming Arabidopsis[J]. J South China Norm Univ (Nat Sci ED), 51(1): 63-68. [陈宗新, 陈俊飞, 王亚琴, 2019. 水稻 C2H2 型锌指蛋白 OsZAT12 转化拟南芥功能的初步研究[J]. 华南师范大学学报（自然科学版）, 51(1): 63-68.]

CHEN K, GAO J, SUN S, et al., 2020. BONZAI proteins control global osmotic stress responses in plants[J]. Curr Biol, 30(24): 4815-4825.

CHEUK A, OUELLET F, HOUDE M, 2020. The barley stripe mosaic virus expression system reveals the wheat C2H2 zinc finger protein TaZFP1B as a key regulator of drought tolerance[J]. BMC Plant Biol, 20(1): 144.

CIFTCI-YILMAZ S, MITTLER R, 2008. The zinc finger network of plants[J]. Cell Mol Life Sci, 65(7-8): 1150-1160.

DANSANA PK, KOTHARI KS, VIJ S, et al., 2014. *OsiSAP1* overexpression improves water-deficit stress tolerance in transgenic rice by affecting expression of endogenous stress-related genes[J]. Plant Cell Rep, 33(9): 1425-1440.

DAVLETOVA S, SCHLAUCH K, COUTU J, et al., 2005. The zinc-finger protein Zat12 plays a central role in reactive oxygen and abiotic stress signaling in *Arabidopsis*[J]. Plant Physiol, 139(2): 847-856.

DINNENY JR, YADEGARI R, FISCHER RL, et al., 2004. The role of JAGGED in shaping lateral organs[J]. Development, 131(5): 1101-1110.

ENGLBRECHT CC, SCHOOF H, BÖHM S, 2004. Conservation, diversification and expansion of C2H2 zinc finger proteins in the *Arabidopsis thaliana* genome[J]. BMC Genom, 5(1): 39.

GOURCILLEAU D, LENNE C, ARMENISE C, et al., 2011. Phylogenetic study of plant Q-type C2H2 zinc finger proteins and expression analysis of poplar genes in response to osmotic, cold and mechanical stresses[J]. DNA Res, 18(2): 77-92.

GUO SQ, HUANG J, JIANG Y, et al., 2007. Cloning and characterization of *RZF71* encoding a C2H2-type zinc finger protein from rice[J]. Yi Chuan, 29(5): 607-613.

HAN G, LU C, GUO J, et al., 2020. C2H2 zinc finger proteins: master regulators of abiotic stress responses in plants[J]. Front Plant Sci, 11: 115.

HAN YC, FU CC, 2019. Cold-inducible *MaC2H2s* are associated with cold stress response of banana fruit via regulating *MaICE1*[J]. Plant Cell Rep, 38(5): 673-680.

KASUGA M, LIU Q, MIURA S, et al., 1999. Improving plant drought, salt, and freezing tolerance by gene transfer of a single stress-inducible transcription factor[J]. Nat Biotechnol, 17(3): 287-291.

LAITY JH, LEE BM, WRIGHT PE, 2001. Zinc finger proteins: New insights into structural and functional diversity[J]. Curr Opin Struct Biol, 11(1): 39-46.

LI MR, LI HQ, 2003. A simple and highly efficient *Agrobacterium*-mediated rice transformation system[J]. Acta Biol Exp Sin, 36(4): 290-294. [李美茹, 李洪清, 2003. 简单高效的根癌农杆菌介导的水稻基因转化方法[J]. 实验生物学报, 36(4): 290-294.]

LIMA JM, NATH M, DOKKU P, et al., 2015. Physiological, anatomical and transcriptional alterations in a rice mutant leading to enhanced water stress tolerance[J]. AoB Plants, 7: plv023.

LIPPUNER V, CYERT MS, GASSER CS, 1996. Two classes of plant cDNA clones differentially complement yeast calcineurin mutants and increase salt tolerance of wild-type yeast[J]. J Biol Chem, 271(22): 12859-12866.

LIU XM, NGUYEN XC, KIM KE, et al., 2013. Phosphorylation of the zinc finger transcriptional regulator ZAT6 by MPK6 regulates Arabidopsis seed germination under salt and osmotic stress[J]. Biochem Biophys Res Commun, 430(3): 1054-1059.

LIVAK KJ, SCHMITTGEN TD, 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method[J]. Methods, 25(4): 402-408.

MA XL, ZHANG QY, ZHU QL, et al., 2015. A robust CRISPR/Cas9 system for convenient, high-efficiency multiplex genome editing in monocot and dicot plants[J]. Mol Plant, 8(8): 1274-1284.

MEISSNER R, MICHAEL AJ, 1997. Isolation and characterisation of a diverse family of Arabidopsis two and three-fingered C2H2 zinc finger protein genes and cDNAs[J]. Plant Mol Biol, 33(4): 615-624.

MITTLER R, KIM Y, SONG L, et al., 2006. Gain- and loss-of-function mutations in *Zat10* enhance the tolerance of plants to abiotic stress[J]. FEBS Lett, 580(28-29): 6537-6542.

MOREAU C, HOFER JM, ELÉOUËT M, et al., 2018. Identification of *Stipules reduced*, a leaf morphology gene in pea (*Pisum sativum*)[J]. New Phytol, 220(1): 288-299.

NGUYEN XC, KIM SH, HUSSAIN S, et al., 2016. A positive transcription factor in osmotic stress tolerance, ZAT10, is regulated by MAP kinases in Arabidopsis[J]. J Plant Biol, 59: 55-61.

OHNO CK, REDDY GV, HEISLER MG, et al., 2004. The Arabidopsis *JAGGED* gene encodes a zinc finger protein that promotes leaf tissue development[J]. Development, 131(5): 1111-1122.

OHTA M, MATSUI K, HIRATSU K, et al., 2001. Repression domains of class II ERF transcriptional repressors share an essential motif for active repression[J]. Plant Cell, 13(8): 1959-1968.

PABO CO., PEISACH E, GRANT RA, 2001. Design and selection of novel Cys2His2 zinc finger proteins[J]. Annu Rev Biochem, 70: 313-340.

REN R, LI D, ZHEN C, et al., 2019. Specific roles of Os4BGlu10, Os6BGlu24, and Os9BGlu33 in seed germination, root elongation, and drought tolerance in rice[J]. Planta, 249(6): 1851-1861.

RODAS AL, ROQUE E, HAMZA R, et al., 2021. MtSUPERMAN plays a key role in compound inflorescence and flower development in *Medicago truncatula*[J]. Plant J, 105(3): 816-830.

ROSSEL JB, WILSON PB, HUSSAIN D, et al., 2007. Systemic and intracellular responses to photooxidative stress in Arabidopsis[J]. Plant Cell, 19(12): 4091-4110.

SAKAMOTO H, ARAKI T, MESHI T, et al., 2000. Expression of a subset of the Arabidopsis Cys2/His2-type zinc-finger protein gene family under water stress[J]. Gene, 248(1-2): 23-32.

SAKAMOTO H, MARUYAMA K, SAKUMA Y, et al., 2004. Arabidopsis Cys2/His2-type zinc-finger proteins function as transcription repressors under drought, cold, and high-salinity stress conditions[J]. Plant Physiol, 136(1): 2734-2746.

SHI H, WANG X, YE T, et al., 2014. The Cysteine2/Histidine2-type transcription factor ZINC FINGER OF ARABIDOPSIS THALIANA 6 modulates biotic and abiotic stress responses by activating salicylic acid-related genes and C-REPEAT-BINDING FACTOR genes in Arabidopsis[J]. Plant Physiol, 165(3): 1367-1379.

SUGANO S, KAMINAKA H, RYBKA Z, et al., 2003. Stress-responsive zinc finger gene *ZPT2-3* plays a role in drought tolerance in petunia[J]. Plant J, 36(6): 830-841.

SUN SJ, GUO SQ, XIA Y, et al., 2010. Functional analysis of a novel Cys2/His2-type zinc finger protein involved in salt tolerance in rice[J]. J Exp Bot, 61(10): 2807-2818.

SUN Z, LIU R, GUO B, et al., 2019. Ectopic expression of *GmZAT4*, a putative C2H2-type zinc finger protein, enhances PEG and NaCl stress tolerances in *Arabidopsis thaliana*[J]. 3 Biotech, 9(5): 166.

TAKATSUJI H, 1999. Zinc-finger proteins: the classical zinc finger emerges in contemporary plant science[J]. Plant Mol Biol, 39(6): 1073-1078.

TAO Z, HUANG Y, ZHANG L, et al., 2017. BnLATE, a Cys2/His2-type zinc-finger protein, enhances silique shattering resistance by negatively regulating lignin accumulation in the silique walls of *Brassica napus*[J]. PLoS One, 12: e0168046.

TENG K, TAN P, GUO W, et al., 2018. Heterologous expression of a novel *Zoysia japonica* C(2)H(2) zinc finger gene, *ZjZFN1*, improved salt tolerance in Arabidopsis[J]. Front Plant Sci, 9: 1159.

VERMA V, RAVINDRAN P, KUMAR PP, 2016. Plant hormone-mediated regulation of stress responses[J]. BMC Plant Biol, 16: 86.

VERSLUES PE, 2016. ABA and cytokinins: challenge and opportunity for plant stress research[J]. Plant Mol Biol, 91(6): 629-640.

VOGEL JT, ZARKA DG, VAN BUSKIRK HA, et al., 2005. Roles of the CBF2 and ZAT12 transcription factors in configuring the low temperature transcriptome of Arabidopsis[J]. Plant J, 41(2): 195-211.

WANG J, ZHANG Q, CUI F, et al., 2017. Genome-wide analysis of gene expression provides new insights into cold responses in *Thellungiella salsuginea*[J]. Front Plant Sci, 8: 713.

WANG K, DING Y, CAI C, et al., 2019. The role of C2H2 zinc finger proteins in plant responses to abiotic stresses[J]. Physiol Plant, 165(4): 690-700.

WANG YQ, CHEN XY, YANG CW, 2011. Transformation of pleiotropic gene *CPR5* from Arabidopsis into Zhonghua 11 (*Oryza sativa* L. subsp. *japonica*) [J]. Acta Scientiarum Nat U Sunyatseni: Nat Sci, 50(4): 84-90. [王亚琴, 陈兴瑶, 阳成伟. 拟南芥多效性基因 *CPR5* 转化水稻中花 11 的研究[J]. 中山大学学报（自然科学版）, 2011, 50(4): 84-90.]

WU FH, SHEN SC, LEE LY, et al., 2009. Tape-Arabidopsis Sandwich-a simpler Arabidopsis protoplast isolation method[J]. Plant Methods, 5: 16.

XIAO H, TANG J, LI Y, et al., 2009. *STAMENLESS 1*, encoding a single C2H2 zinc finger protein, regulates floral organ identity in rice[J]. Plant J, 59(5): 789-801.

XIE YJ, MAO Y, LAI DW, et al., 2012. H_2 enhances Arabidopsis salt tolerance by manipulating ZAT10/12-mediated antioxidant defence and controlling sodium exclusion[J]. PLoS One, 7(11): e49800.

XU DQ, HUANG J, GUO SQ, et al., 2008. Overexpression of a TFIIIA-type zinc finger protein gene *ZFP252* enhances drought and salt tolerance in rice (*Oryza sativa* L.)[J]. FEBS Lett, 582(7): 1037-1043.

YAMAGUCHI-SHINOZAKI K, SHINOZAKI K, 2006. Transcriptional regulatory networks in cellular responses and tolerance to dehydration and cold stresses[J]. Annu Rev Plant Biol, 57: 781-803.

YIN J, WANG L, ZHAO J, et al., 2020. Genome-wide characterization of the C2H2 zinc-finger genes in *Cucumis sativus* and functional analyses of four *CsZFPs* in response to stresses[J]. BMC Plant Biol, 20(1): 359.

YIN M, WANG Y, ZHANG L, et al., 2017. The Arabidopsis Cys2/His2 zinc finger transcription factor ZAT18 is a positive regulator of plant tolerance to drought stress[J]. J Exp Bot, 68(11):

2991-3005.

YU GH, JIANG LL, MA XF, et al., 2014. A soybean C2H2-type zinc finger gene *GmZF1* enhanced cold tolerance in transgenic Arabidopsis[J]. PLoS One, 9(10): e109399.

ZHANG H, LIU Y, WEN F, et al., 2014. A novel rice C2H2-type zinc finger protein, ZFP36, is a key player involved in abscisic acid-induced antioxidant defence and oxidative stress tolerance in rice[J]. J Exp Bot, 65(20): 5795-5809.

ZHANG H, NI L, LIU Y, et al., 2012. The C2H2-type zinc finger protein ZFP182 is involved in abscisic acid-induced antioxidant defense in rice[J]. J Integr Plant Biol, 54(7): 500-510.

ZHANG S, LIU J, ZHONG G, et al., 2021. Genome-wide identification and expression patterns of the C2H2-zinc finger gene family related to stress responses and catechins accumulation in *Camellia sinensis* [L.] O. Kuntze[J]. Int J Mol Sci, 22(8): 4197.

ZHANG X, GUO X, LEI C, et al, 2011. Overexpression of *SlCZFP1*, a novel TFIIIA-type zinc finger protein from tomato, confers enhanced cold tolerance in transgenic Arabidopsis and rice[J]. Plant Mol Biol Rep, 29: 185-196.

ZHUANG H, WANG HL, ZHANG T, et al., 2020. *NONSTOP GLUMES1* encodes a C2H2 zinc finger protein that regulates spikelet development in rice[J]. Plant Cell, 32(2): 392-413.